

**PCT**  
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : <p style="text-align: center;"><b>C12Q 1/44, G01N 33/58</b></p>	<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/58504</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>5. Oktober 2000 (05.10.00)</b>		
<table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">           (21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP00/02121</b>             (22) Internationales Anmeldedatum: <b>10. März 2000 (10.03.00)</b>             (30) Prioritätsdaten:  <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span>199 13 858.3</span> <span>26. März 1999 (26.03.99)</span> <span>DE</span> </div>             (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>STUDIENGESELLSCHAFT KOHLE MBH [DE/DE];</b>  <b>Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE).</b>             (72) Erfinder; und            (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>REETZ, Manfred, Theodor [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE). BECKER, Michael, Heinrich [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE). STÖCKIGT, Detlef [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE). KLEIN, Heinz-Werner [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE).</b>             (74) Anwälte: <b>VON KREISLER, Alek usw.; Deichmannhaus am Hauptbahnhof, Bahnhofsvorplatz 1, D-50667 Köln (DE).</b> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">           (81) Bestimmungsstaaten: <b>CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b>   <b>Veröffentlicht</b>  <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> </td> </tr> </table>			(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP00/02121</b>  (22) Internationales Anmeldedatum: <b>10. März 2000 (10.03.00)</b>  (30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span>199 13 858.3</span> <span>26. März 1999 (26.03.99)</span> <span>DE</span> </div> (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>STUDIENGESELLSCHAFT KOHLE MBH [DE/DE];</b> <b>Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE).</b>  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>REETZ, Manfred, Theodor [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE). BECKER, Michael, Heinrich [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE). STÖCKIGT, Detlef [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE). KLEIN, Heinz-Werner [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE).</b>  (74) Anwälte: <b>VON KREISLER, Alek usw.; Deichmannhaus am Hauptbahnhof, Bahnhofsvorplatz 1, D-50667 Köln (DE).</b>	(81) Bestimmungsstaaten: <b>CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b>  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP00/02121</b>  (22) Internationales Anmeldedatum: <b>10. März 2000 (10.03.00)</b>  (30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span>199 13 858.3</span> <span>26. März 1999 (26.03.99)</span> <span>DE</span> </div> (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>STUDIENGESELLSCHAFT KOHLE MBH [DE/DE];</b> <b>Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE).</b>  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>REETZ, Manfred, Theodor [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE). BECKER, Michael, Heinrich [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE). STÖCKIGT, Detlef [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE). KLEIN, Heinz-Werner [DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Platz 1, D-45470 Mülheim an der Ruhr (DE).</b>  (74) Anwälte: <b>VON KREISLER, Alek usw.; Deichmannhaus am Hauptbahnhof, Bahnhofsvorplatz 1, D-50667 Köln (DE).</b>	(81) Bestimmungsstaaten: <b>CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b>  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>			

(54) Title: **HIGH THROUGHPUT SCREENING METHOD FOR DETERMINING ENANTIOSELECTIVITY**

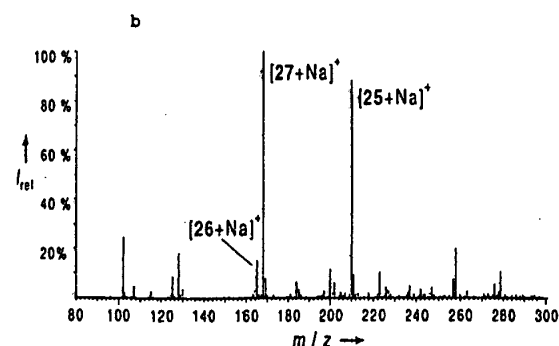
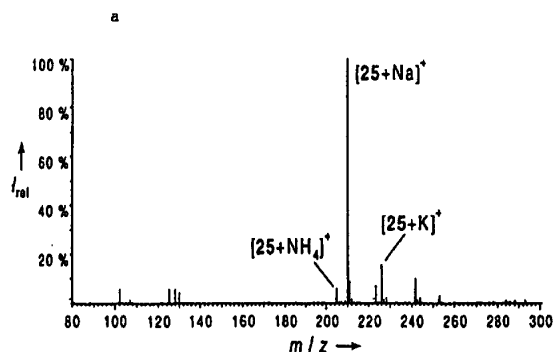
(54) Bezeichnung: **HIGH-THROUGHPUT-SCREENING-VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON ENANTIOSELEKTIVITÄT**

(57) Abstract

The present invention relates to a method for determining the enantioselectivity of kinetic racemate resolutions and of asymmetrical reactions of prochiral compounds carrying enantiotopic groups. According to the inventive method, isotopic substrates are used in such a way that an isotope-specific detection system, e.g. an ESI mass spectrometer, can determine the quantity of the reaction products. The method can be combined to an automated sampling and can thus be used for high throughput screening. The enantioselective material conversions relevant in the process can be induced by chiral homogeneous or heterogeneous catalysts, biocatalysts or stoichiometric quantities of optically active agents.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Enantioselectivität von kinetischen Racematspaltungen und von asymmetrisch verlaufenden Reaktionen prochiraler Verbindungen, die enantiotopie Gruppen tragen, in dem isotoopenmarkierte Substrate verwendet werden, so dass mit einem isotoopenspezifischen Detektionssystem, z.B. einem ESI-Massenspektrometer, die Reaktionsprodukte quantitativ bestimmt werden können. In Verbindung mit einer automatisierten Probenaufgabe kann das Verfahren zum *High-Throughput-Screening* eingesetzt werden. Die dabei relevanten enantioselectiven Stoffumwandlungen können durch chirale homogene oder heterogene Katalysatoren, Biokatalysatoren oder durch stöchiometrische Mengen optisch aktiver Agzien induziert werden.



# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## HIGH-THROUGHPUT-SCREENING-VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON ENANTIOSELEKTIVITÄT

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Enantioselektivität von kinetischen Racematspaltungen und von asymmetrisch verlaufenden Reaktionen prochiraler Verbindungen, die enantiotopische Gruppen tragen, in dem isotope-markierte Substrate verwendet werden, so daß mit einem isotope-spezifischen Detektionssystem, z. B. einem ESI-Massenspektrometer, die Reaktionsprodukte quantitativ bestimmt werden können. In Verbindung mit einer automatisierten Probenaufgabe kann das Verfahren zum *High-Throughput-Screening* eingesetzt werden. Die dabei relevanten enantioselektiven Stoffumwandlungen können durch chirale homogene oder heterogene Katalysatoren, Biokatalysatoren oder durch stöchiometrische Mengen optisch aktiver Agenzien induziert werden.

Die Entwicklung effektiver Verfahren zur Generierung umfangreicher Bibliotheken chiraler Chemie-Katalysatoren durch Methoden der kombinatorischen Chemie {a) G. Liu, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7712-7713; b) K. Burgess, H.-J. Lim, A. M. Porte, G. A. Sulikowski, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 192-194; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 220-222; c) B. M. Cole, K. D. Shimizu, C. A. Krueger, J. P. A. Harrity, M. L. Snapper, A. H. Hoveyda, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1776-1779; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1668-1671; d) C. Gennari, H. P. Nestler, U. Piarulli, B. Salom, *Liebigs Ann./Recl.* **1997**, 637-647} oder zur Herstellung von Bibliotheken enantioselektiver Biokatalysatoren durch *in vitro*-Evolution [M. T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, K.-E. Jaeger, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2961-2963; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2830-2932] ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Entscheidend für den Erfolg dieser neuen Technologien ist das Vorhandensein von effektiven und raschen Methoden zum Durchsuchen und Auffinden der enantioselektivsten Katalysatoren oder Biokatalysatoren aus den jeweiligen Katalysator-Bibliotheken. Während in der kombinatorischen Wirkstoffchemie viele effektive Methoden zum Durchsuchen großer Bibliotheken von biologisch aktiven Verbindungen zur Verfügung stehen [a) F. Balkenhohl, C. von dem Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2436-2488; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2288-2337; b) J. S. Früchtel, G. Jung, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 19-46; *Angew. Chem., Int.*

Ed. Engl. 1996, 35, 17-42; c) *Chem. Rev.* 1997, 97 (2), 347-510 (Sonderausgabe über kombinatorische Chemie); d) S. R. Wilson, A. W. Czarnick, *Combinatorial Chemistry: Synthesis and Application*, Wiley, New York, 1997], steht die Entwicklung von Methoden zum *High-Throughput-Screening* von enantioselektiven Katalysatoren, Biokatalysatoren oder optisch aktiven Agenzien erst am Anfang. Die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses (engl. enantiomeric excess, *ee*) der Produkte stereoselektiver Stoffumwandlungen erfolgt normalerweise klassisch mit Hilfe der Gas- oder Flüssigkeitschromatographie an chiralen stationären Phasen [G. Schomburg, *Gaschromatographie: Grundlagen, Praxis, Kapillartechnik*, 2. Aufl., VCH, Weinheim, 1987; K. K. Unger, *Packings and stationary phases in chromatographic techniques*, Series Chromatographic science; v. 47, Marcel Dekker, New York, 1990]. Obwohl hierbei genaue *ee*-Werte ermittelt werden können, haben solche herkömmlichen Verfahren den Nachteil, dass nur eine begrenzte Zahl von Proben pro Zeiteinheit untersucht werden kann, denn die Analysenzeiten hängen von den jeweiligen Retentionszeiten ab.

Um Analysenprobleme dieser Art zu lösen, wurden kürzlich die ersten Vorschläge gemacht. So wurde z. B. im Rahmen einer Untersuchung zur *in vitro*-Evolution von enantioselektiven Lipasen ein relativ grobes Testverfahren entwickelt, wonach der Verlauf enantioselektiver Hydrolysen von chiralen Carbonsäureestern ermittelt werden kann [M. T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, K.-E. Jaeger, *Angew. Chem.* 1997, 109, 2961-2963; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1997, 36, 2830-2932]. Dabei werden die von Lipase-Mutanten katalysierten Hydrolysen von (*R*)- und (*S*)-konfigurierten Carbonsäure-*p*-nitrophenolestern auf Mikrotiterplatten spektrophotometrisch zeitlich verfolgt, wodurch die enantioselektivsten Mutanten rasch identifiziert werden können. Abgesehen davon, dass keine exakten *ee*-Werte zugänglich sind, ist dieses Verfahren auf die Stoffklasse der chiralen Carbonsäuren beschränkt. Gleiches gilt für eine verwandte Testverfahren [L. E. Janes, R. J. Kazlauskas, *J. Org. Chem.* 1997, 62, 4560-4561]. Diese Einschränkung gilt auch für verwandte Verfahren, die auf Farbänderung von pH-Indikatoren während einer Esterhydrolyse beruhen [L. E. Janes, A. C. Löwendahl, R. J. Kazlauskas, *Chem. Eur. J.* 1998, 4, 2324-2331]. Ein völlig anderer Ansatz zur Identifizierung chiraler Katalysatoren bezieht sich auf IR-Thermographie [M. T. Reetz, M. H. Becker, K. M. Kühling, A. Holzwarth, *Angew. Chem.* 1998, 110, 2792-2795; *Angew. Chem., Int. Ed.* 1998, 37, 2547-2650]. Allerdings steht die Weiterentwicklung dieser

Methode unter Ermöglichung einer quantitativen Analyse enantioselektiver Reaktionen noch aus.

Die vorliegende Erfindung behebt diese Unzulänglichkeiten dadurch, daß für kinetische Racematspaltungen oder auch für stereoselektive Reaktionen mit enantiotope Gruppen enthaltenden prochiralen Substraten teilweise oder vollständig isotope markierte Substrate oder Substrate mit einer von der natürlichen Verteilung abweichenden Isotopenverteilung eingesetzt werden. Dies erlaubt den Einsatz eines isotopenspezifischen Detektionssystems, z. B. einer massenspektrometrischen Ionisierungsmethode, zur quantitativen Bestimmung des Umsatzes oder der relativen Verhältnisse der pseudo-Enantiomeren oder der Enantiomerenüberschüsse.

Im Vergleich zu den bisherigen Ansätzen bietet die vorliegende Erfindung folgende Vorteile:

- 1) Exakte Bestimmung der *ee*-Werte von kinetischen Racematspaltungen und von asymmetrisch verlaufenden Stoffumwandlungen prochiraler Verbindungen, die enantiotope Gruppen tragen, wobei keine Einschränkungen hinsichtlich der Stoffklasse oder des Reaktionstyps gemacht werden.
- 2) Exakte Bestimmung des Umsatzes der unter 1) erwähnten Reaktionen.
- 3) Der rasche bzw. der Hochdurchsatztest der unter 1) und 2) erwähnten Daten, wobei speziell mindestens 1000 Bestimmungen pro Tag möglich sind.

Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Detektionssysteme sind Massenspektrometer, insbesondere solche mit Elektrospray-Ionisierung (ESI) [J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science (Washington, D. C.)* 1989, 246, 64-71] oder Matrix-unterstützte Laserdesorption/ionisierung (MALDI) [a) K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988, 2, 151-153; b) M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* 1988, 60, 2299-2301]. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich in Verbindung mit einer automatisierten Probenaufgabe (Verwendung von einem oder mehreren Probenaufgabern und Mikrotiterplatten), evtl.

auch unter Einsatz mehrerer Spektrometer, als High-Throughput-Screening Methode.

Das Verfahren kann verwendet werden um chirale Katalysatoren oder chirale Agenzien für asymmetrisch verlaufende Reaktionen aufzufinden bzw. zu optimieren. Hierzu zählen

- a) chirale Katalysatoren oder chirale Agenzien für die kinetische Racematspaltung von Alkoholen, Carbonsäuren, Carbonsäureestern, Aminen, Amiden, Olefinen, Alkinen, Phosphinen, Phosphoniten, Phosphiten, Phosphaten, Halogeniden, Oxiranen, Thiolen, Sulfiden, Sulfonen, Sulfoxiden, Sulfonamiden sowie deren Derivate;
- b) chirale Katalysatoren (z. B. chirale homogene oder chiral-modifizierte heterogene Katalysatoren, chirale Metallkomplexe) oder chirale Agenzien für die stereoselektive Umsetzung von prochiralen Verbindungen, deren enantiotope Gruppen eine oder mehrere funktionelle Gruppen aus den Substanzklassen der Alkohole, Carbonsäuren, Carbonsäureester, Amine, Amide, Olefine, Alkine, Phosphine, Phosphonite, Phosphite, Phosphate, Halogenide, Oxirane, Thiole, Sulfide, Sulfone, Sulfoxide oder Sulfonamide oder deren Derivate umfassen;
- c) Biokatalysatoren, z. B. Enzyme, Antikörper, Proteine, Hormone, Phagen, Ribozyme, Peptide oder sonstige Biopolymere, für die kinetische Racematspaltung von Alkoholen, Carbonsäuren, Carbonsäureestern, Aminen, Amiden, Olefinen, Alkinen, Phosphinen, Phosphoniten, Phosphiten, Phosphaten, Halogeniden, Oxiranen, Thiolen, Sulfiden, Sulfonen, Sulfoxiden, Sulfonamiden sowie deren Derivate und für die stereoselektive Umsetzung von prochiralen Verbindungen, deren enantiotope Gruppen eine oder mehrere funktionelle Gruppen aus den Substanzklassen der Alkohole, Carbonsäuren, Carbonsäureester, Amine, Amide, Olefine, Alkine, Phosphine, Phosphonite, Phosphite, Phosphate, Halogenide, Oxirane, Thiole, Sulfide, Sulfone, Sulfoxide oder Sulfonamide oder deren Derivate.

Das zugrunde liegende Prinzip der Erfindung basiert auf der Verwendung von isotoopenmarkierten Substraten in Form von *pseudo*-Enantiomeren oder *pseudo*-prochiralen Verbindungen, wie in Schema 1 dargestellt.

Wird in einem herkömmlichen Racemat die eine enantiomere Form isotoopenmarkiert, so nennt man solche Verbindungen *pseudo*-Enantiomere. Markiert man eine enantiotope Gruppe eines prochiralen Substrats mit Isotopen, so nennt man die Verbindung *pseudo*-prochiral, so z. B. *pseudo-meso*. Je nachdem welche Typen von enantioselektiven Umwandlungen im Rahmen der Erfindung untersucht bzw. getestet werden sollen, sind unterschiedliche Situationen relevant, so z. B. Fall a, Fall b, Fall c und Fall d in Schema 1. Bei kinetischen Racematspaltungen von beliebigen chiralen Verbindungen werden 1 und 2, die sich in der absoluten Konfiguration und in der Isotoopenmarkierung in den funktionellen Gruppen FG\* unterscheiden, in enantiomerenreiner Form hergestellt und im Verhältnis von 1 : 1 gemischt, so dass ein Racemat simuliert wird (Schema 1a). Nach einer enantioselektiven Umwandlung, bei der die chemische Reaktion an der funktionellen Gruppe eintritt (im Idealfall einer kinetischen Antipodenspaltung bis zu einem Umsatz von 50 %), entstehen echte Enantiomere 3 und 4 neben nicht-markierten und markierten achiralen Nebenprodukten 5 bzw. 6.

Die Verhältnisse der Intensitäten von 1/2 und 5/6 in den Massenspektren ( $m/z$  Intensitäten der Quasi-Molekülonen) erlauben die quantitative Ermittlung der Enantioselektivität (*ee*-Werte) und des Umsatzes. Gegebenenfalls kann im Rahmen der Erfindung auch ein innerer Standard verwendet werden. Von Fall zu Fall kann es vorteilhaft sein, die Isotoopenmarkierung nicht in der funktionellen Gruppe, sondern im Rest R<sup>2</sup> des Substrats vorzunehmen, wie in Schema 1b skizziert. In diesem Fall entsteht ein neues Paar von *pseudo*-Enantiomeren 3/8 (Schema 1b), wobei Enantioselektivität und Umsatz durch Messung der  $m/z$ -Intensitäten der Quasi-Molekülonen von 1/7 und 3/8 erfindungsgemäß ermittelt werden. Somit sind in beiden Fällen auch die sogenannten Selektivitätsfaktoren (*s*- oder *E*-Werte [H. B. Kagan, J. C. Fiaud in *Top. Stereochem.*, Vol. 18 (Hrsg.: E. L. Eliel, S. H. Wilen), Wiley, New York, 1988, S. 249-330] automatisch zugänglich.

Im Falle von prochiralen Substraten mit enantiotopen Gruppen ist im Rahmen des erfindungsgemäßen *Screeningsystems* die Synthese einer einzigen *pseudo*-prochiralen Verbindung erforderlich. Ist das relevante Substrat eine *meso*-Verbindung, so wird zunächst eine entsprechende *pseudo-meso*-Verbindung 9 hergestellt, denn die zu untersuchende stereo-differenzierende Reaktion ergibt eine Mischung von zwei MS-detektierbaren *pseudo*-Enantiomeren 10 und 11 (Schema 1c). Erfindungsgemäß gilt die analoge Vorgehensweise für andere prochirale

Substrate mit enantiotopen Gruppen, so z. B. die Verwendung von *pseudo*-prochiralen Substraten des Typs 12 (Schema 1d).

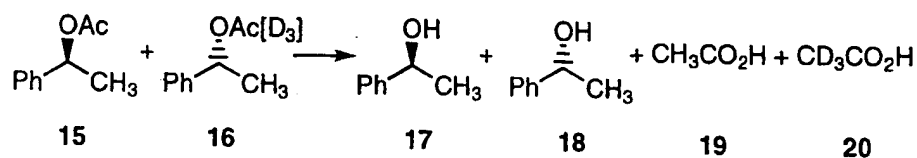
Die FG-Einheiten in Schema 1 können die unterschiedlichsten funktionellen Gruppen der organischen Chemie sein. Typische Vertreter sind Acyloxy-Reste (-OC(O)R), Thioacyloxy-Reste (-SC(O)R), Amido-Reste (-NHC(O)R), Carboxyl-Reste (-CO<sub>2</sub>R) im Falle von Spaltungsreaktionen wie z. B. Hydrolysen, ferner Hydroxy-Reste (-OH), Thiol-Reste (-SH), Amino-Reste (-NH<sub>2</sub> oder -NHR) oder Carboxy-Reste (-CO<sub>2</sub>H) im Falle von verknüpfenden Reaktionen wie Acylierungen oder Veresterungen.

Schema 1 dient nur zur Illustration bzw. Beschreibung der erfindungsgemäßen Methode und schränkt diese in keiner Weise ein. Vielmehr sind die unterschiedlichsten Substanzklassen und Reaktionstypen möglich, sofern die Substrate entweder chiral sind wie naturgemäß bei einer kinetischen Racematspaltung oder sie sind prochiral und enthalten enantiotope Gruppen.

Um einen hohen Probendurchsatz zu gewährleisten, sieht die Erfindung einen Geräteaufbau vor, wie er beispielhaft in Schema 2 skizzierte ist. Mit dieser Kombination von kommerziell erhältlichen Geräten bzw. Apparateteilen ist es möglich, mindestens 1000 *ee*-Bestimmungen pro Tag mit einer Genauigkeit von  $\pm 5\%$  durchzuführen.

#### Beispiel 1. Kinetische Racematspaltung von 1-Phenylethylacetat

Die hydrolytische kinetische Racematspaltung von 1-Phenylethylacetat, katalysiert durch z. B. Enzyme wie Lipasen (Wildtyp oder Mutanten) wird mit der in Schema 2 beschriebenen Konfiguration im Rahmen eines *High-Throughput-Screenings* verfolgt, d. h. es werden *ee*- und Umsatzbestimmungen durchgeführt.



## Synthese von (1S)-1-Phenylethylacetat (15):

In einem 25 ml-Stickstoffkolben werden unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss 8.28 mmol (1.01 g, 1.00 ml) (S)-1-Phenylethanol (Fluka, 99 % ee), 12.4 mmol (1.50 Äq., 983 mg, 1.00 ml) Pyridin und 15 ml Dichlormethan vorgelegt und auf 0 °C (Eisbad) gekühlt. Unter Rühren werden innerhalb von 10 min 10.8 mmol (1.30 Äq., 1.10 g, 1.02 ml) Acetanhydrid zugetropft. In einem Zeitraum von 12 h wird auf Raumtemperatur erwärmt und sukzessive mit je zweimal 20 ml 1 M Salzsäurelösung, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trockenmittel durch Filtration getrennt und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde auf Kieselgel aufgetragen und chromatographisch gereinigt (Laufmittel: Hexan : Essigsäure-ethylester = 9 : 1). Die Produktfraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Nach Trocknen im Ölpumpenvakuum verbleibt eine klare Flüssigkeit (1.25 g, 7.62 mmol, 92 %). Analytik: <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$  = 1.52 (d) <sup>3</sup>J = 6.6 Hz [3H], 2.06 (s) [3H], 5.94 (q) <sup>3</sup>J = 6.6 Hz [1H], 7.24-7.38 (m) [5H]; <sup>13</sup>C-{<sup>1</sup>H}-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz):  $\delta$  = 21.4 (s), 22.2 (s), 72.3 (s), 126.1 (s), 127.9 (s), 128.5 (s), 141.7 (s), 170.3 (s); MS (EI, 70 eV, pos. Ionen): m/z (% rel. Int.): 164 (25) [M<sup>+</sup>], 122 (77), 107 (36), 105 (69), 104 (100), 103 (24), 79 (27), 78 (27), 77 (43), 51 (24), 43 (90); EA: C: 72.95 % (ber. 73.15 %), H: 7.28 % (ber. 7.37 %); GC (Hewlett Packard 5890, 25 m fused silica, 0.25 innerer Durchmesser, 2,6-Dimethyl-3-pentyl- $\beta$ -CD (95 % Methyl-/5 % Phenylpolysiloxan), FID, 80 °C, 4 °C min<sup>-1</sup>, 120 °C 0.2 min iso, 0.63 bar Wasserstoff): 99.8 % ee.

## Synthese von (1R)-1-Phenylethyl-trideuteroacetat (16):

In einem 25 ml-Stickstoffkolben werden unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss 8.28 mmol (1.01 g, 1.00 ml) (R)-1-Phenylethanol (Fluka, 99 % ee), 12.4 mmol (1.50 Äq., 983 mg, 1.00 ml) Pyridin und 15 ml Dichlormethan vorgelegt und auf 0 °C (Eisbad) gekühlt. Unter Rühren werden innerhalb von 10 min 10.8 mmol (1.3 Äq., 1.16 g, 1.02 ml) d<sub>6</sub>-Acetanhydrid (99 Atom% D, Aldrich) zugetropft. Innerhalb von 12 h wird auf Raumtemperatur erwärmt und sukzessive mit je zweimal 20 ml 1 M Salzsäurelösung, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trockenmittel durch Filtration getrennt und am

Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde auf Kieselgel aufgetragen und chromatographisch gereinigt (Laufmittel: Hexan : Essigsäureethylester = 9 : 1). Die Produktfraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Nach Trocknen im Ölpumpenvakuum verbleibt eine klare Flüssigkeit (1.28 g, 7.65 mmol, 92 %). Analytik:  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):  $\delta$  = 1.53 (d)  $^3J$  = 6.6 Hz [3H], 5.88 (q)  $^3J$  = 6.6 Hz [1H], 7.24-7.36 (m) [5H];  $^{13}\text{C}$ -{ $^1\text{H}$ }-NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz):  $\delta$  = 22.2 (s), 72.3 (s), 126.1 (s), 127.7 (s), 128.5 (s), 141.7 (s), 170.3 (s); MS (EI, 70 eV, pos. Ionen):  $m/z$  (% rel. Int.): 167 (24) [ $\text{M}^+$ ], 123 (77), 108 (39), 105 (67), 104 (100), 103 (25), 78 (27), 77 (35), 51 (19), 46 (65), 43 (14); EA: C: 71.77 % (ber. 71.83 %), H+D: 6.98 % (ber. 7.23 %); GC (Hewlett Packard 5890, 25 m fused silica, 0.25 innerer Durchmesser, 2,6-Dimethyl-3-pentyl- $\beta$ -CD (95 % Methyl- / 5 % Phenylpolysiloxan), FID, 80 °C, 4 °C  $\text{min}^{-1}$ , 120 °C 0.2 min iso, 0.63 bar Wasserstoff): 99.8 % ee.

In Vorversuchen wurden die *pseudo*-Enantiomere 15 und 16 in verschiedenen Verhältnissen gemischt. Die dabei resultierenden Mischungen wurden zunächst mit Hilfe der herkömmlichen Gaschromatographie an chiraler stationärer Phase untersucht, um die *pseudo-ee*-Werte zu ermitteln. Die gleichen Proben wurden dann mit ESI-MS untersucht. Ein typisches ESI-Massenspektrum ist in Abb. 1 gezeigt. Der Vergleich der zwei Datensätze zeigt Übereinstimmung im Rahmen von  $\pm 5$  % (Tabelle 1).

Tabelle 1

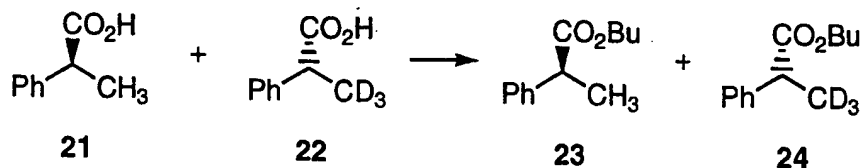
Probe	<i>ee</i> (GC)	<i>ee</i> (ESI-MS)
1	100	100
2	91	90
3	81	79
4	74	73
5	60	57
6	56	54
7	48	48
8	28	27
9	10	10
10	23	20
11	40	38
12	45	43
13	55	53
14	65	60
15	75	74
16	95	93
17	100	100

Sodann wurden 1:1-Gemische der *pseudo*-Enantiomere 15/16 mit unterschiedlichen Lipasen (Wildtyp und Mutanten, z. B. aus *P. aeruginosa*) auf Mikrotiterplatten hydrolysiert und mit dem in Schema 2 beschriebenen Screeningsystem auf Enantioselektivität und Umsatz untersucht. Dabei ließen sich etwa 1000 exakte *ee*-Bestimmungen pro Tag durchführen. Im einzelnen wurden 10  $\mu\text{L}$  einer 1 mM 1:1-Mischung von 15 und 16 in  $\text{CH}_3\text{OH}$  wurden in das Rheodyne®-Ventil eines ESI-MS-Systems (ESI-MS-Bedingungen: HP 5989B MS Engine Quadropol Massenspektrometer ausgerüstet mit einer HP 59987A API Elektrosprayquelle II mit Hexapol Ionenführung (Analytica of Branford) und ChemStation®; Datenaufnahme: *Scan*-Spektren im positiv Ionenmodus;  $m/z$  90-300; in  $m/z$  0.1 Schritten, Einheitsauflösung, Gauss' Massenfilter  $m/z$  0.3 min; Gauss' Zeitfilter 0.05 min; API-Quellen-Bedingungen: Potentialdifferenz zwischen der *Spray*-Nadel und erster Elektrode: -5250 V, Druck des  $\text{N}_2$ -Nebulizer-Gases: 80

psi, Fluß des  $N_2$ -Trocknungsgases ca.  $9 \text{ L min}^{-1}$  ( $150^\circ\text{C}$ ), Lösungsmittelfluss  $0.06 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O} = 8 : 2$ . Es wurden ca. 20-30 ESI-Massenspektren summiert und die Verhältnisse von 15 und 16 wurden durch die absoluten Intensitäten der Signale der entsprechenden Natriumaddukte ( $[\text{15}+\text{Na}]^+$  und  $[\text{16}+\text{Na}]^+$ , Abb. 1) bestimmt. Die Verhältnisse der Signale (und somit auch die *ee*-Werte der synthetischen Mischungen von 15 und 16) wurden durch ein Makro automatisch aus der *m/z*-Intensitätsliste der einzelnen Messungen in eine Excel®-Tabelle übertragen.

### Beispiel 2. Kinetische Racematspaltung von 2-Phenylpropionsäure

In diesem Beispiel wird die enantioselektive Veresterung von 2-Phenylpropionsäure im Rahmen einer Lipase-katalysierten kinetischen Racematspaltung beschrieben. Dazu wurden zunächst die *pseudo*-Enantiomere 21/22 synthetisiert.



Synthese von 22:

Synthese von (4*R*)-Benzyl-3-*N*-benzyloxy-2-oxazolidin-2-on:

In einem 250 ml-Stickstoffkolben werden unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss 24.0 mmol (4.52 g) (4*R*)-Benzyloxazolidin-2-on (Fluka) in 80 ml Tetrahydrofuran gelöst und auf  $-78^\circ\text{C}$  (Trockeneisbad) gekühlt. Unter Rühren werden innerhalb von 15 min 24.0 mmol (15.0 ml einer 1.6 M Lösung) *n*-Butyllithium in Hexan zugetropft. Nach 90 min wird bei  $-78^\circ\text{C}$  eine Lösung von frisch destilliertem Phenyllessigsäurechlorid (24.0 mmol, 3.71 g, 3.18 ml) und 10 ml Tetrahydrofuran innerhalb von 10 min zugetropft. Nach beendetem Zutropfen wird das Trockeneisbad durch ein Eisbad ersetzt. Nach Rühren bei  $0^\circ\text{C}$  für 1 h wird die Reaktion durch Zugabe von 25 ml einer gesättigten Ammoniumchlorid-Lösung beendet, und es wird eine weitere Stunde bei  $0^\circ\text{C}$  gerührt. Das Reaktionsgemisch wird im Anschluß in einen 250 ml-Kolben überführt, und das organische Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit 60 ml Diethylether, zweimal mit je 70 ml 1 M Natronlauge, 1 M Salzsäure und

gesättigter Natriumchloridlösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trockenmittel durch Filtration getrennt und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde auf Kieselgel aufgetragen und chromatographisch gereinigt (Laufmittel: Hexan : Essigsäureethylester = 3 : 1). Die Produktfraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Nach Trocknen im Ölpumpenvakuum verbleibt eine klare Flüssigkeit (5.88 g, 19.9 mmol, 83 %). Analytik:  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  = 2.67 (dd),  $^3J$  = 9.5 Hz,  $^3J$  = 13.4 Hz [1H], 3.27 (dd)  $^3J$  = 3.3 Hz,  $^2J$  = 13.4 Hz [1H], 4.14-4.23 (m) [1H], 4.26 (d)  $^2J$  = 15.7 Hz [1H], 4.35 (d)  $^2J$  = 15.7 Hz [1H], 4.65-4.70 (m) [1H], 7.25-7.36 (m) [10H];  $^{13}\text{C}$ -{1H}-NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  = 37.7 (s), 41.6 (s), 55.3 (s), 66.1 (s), 127.26 (s), 127.34 (s), 128.3 (s), 128.6 (s), 128.9 (s), 129.4 (s), 129.8 (s), 130.0 (s), 133.5 (s), 135.1 (s), 153.4 (s), 171.2 (s); MS (EI, 70 eV, pos. Ionen):  $m/z$  (% rel. Int.): 295 (44) [ $\text{M}^+$ ], 178 (6), 119 (16), 118 (100), 117 (9), 91 (88), 90 (11), 65 (12); EA: C: 73.31 % (ber. 73.20 %), H: 5.72 % (ber. 5.80 %), N: 4.68 % (ber. 4.74 %).

Synthese von (4R)-Benzyl-3N-((2R)-3,3,3-trideutero-2-phenylpropionyl)-oxazolidin-2-on:

In einem 250 ml-Stickstoffkolben werden unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss 18.0 mmol (3.29 g) Natriumhexamethyldisilazid in ca. 50 ml Tetrahydrofuran gelöst und auf  $-78^\circ\text{C}$  (Trockeneisbad) gekühlt. Unter Rühren wird innerhalb von 30 min eine Lösung von 18.0 mmol (5.30 g) (4R)-Benzyl-3N-benzyloxy-2-oxazolidin-2-on in 25 ml Tetrahydrofuran zugetropft. Nach 90 min Rühren bei  $-78^\circ\text{C}$  wird eine Lösung aus 90.0 mmol (13.0 g, 5.60 ml)  $d_3$ -Methyliodid (99 Atom-% D, Aldrich) und 20 ml Tetrahydrofuran innerhalb von 30 min zugetropft. Es wird bei  $-78^\circ\text{C}$  für weitere 12 h gerührt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 30 ml einer gesättigten Ammoniumchlorid-Lösung beendet. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch in einen 250 ml-Kolben überführt und das organische Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit 60 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten etherischen Phasen werden zweimal mit je 50 ml 10%iger Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trockenmittel durch Filtration getrennt und am

Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wird aus Ether/Essigsäureethylester umkristallisiert. Nach Filtration und Trocknen im Ölpumpenvakuum wird ein farbloser Feststoff erhalten (4.67 g, 14.9 mmol, 83 %). Analytik:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  = 2.80 (dd)  $^3J$  = 9.8 Hz,  $^2J$  = 13.3 Hz [1H], 3.35 (dd)  $^3J$  = 3.2 Hz,  $^2J$  = 13.3 Hz [1H], 4.02-4.13 (m) [2H], 4.55-4.62 (m) [2H], 5.10 (s) [1H], 7.21-7.38 (m) [10H];  $^{13}\text{C-}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  = 37.9 (s), 42.9 (s), 55.8 (s), 65.9 (s), 127.3 (s), 127.4 (s), 128.1 (s), 128.7 (s), 129.0 (s), 129.4 (s), 135.3 (s), 140.2 (s), 152.9 (s), 174.6; MS (EI, 70 eV, pos. Ionen):  $m/z$  (% rel. Int.): 312 (34) [ $\text{M}^+$ ], 135 (100), 108 (72), 107 (18), 91 (14); EA: C: 73.16 % (ber. 73.05 %), H+D: 6.00 % (ber. 6.13 %), N: 4.41 % (ber. 4.48 %).

Synthese von (2*R*)-3,3,3-trideutero-2-phenylpropionsäure (22):

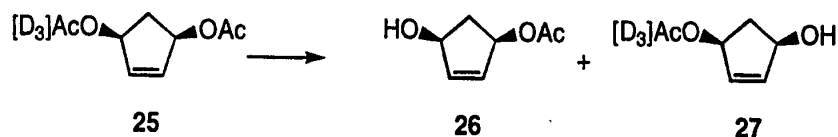
In einem 250 ml-Stickstoffkolben werden 11.6 mmol (3.64 g) (4*R*)-Benzyl-3*N*-((2*R*)-3,3,3-trideutero-2-phenylpropionyl)-oxazolidin-2-on in ca. 100 ml Tetrahydrofuran gelöst und die erhaltene Lösung auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren wird eine Lösung von 23.3 mmol (978 mg) Lithiumhydroxid-Monohydrat in 18.0 ml einer 30%igen wäßrigen Wasserstoffperoxidlösung unter Rühren zugegeben. Anschließend wird bei 0 °C für 18 h gerührt. Die Reaktion wird bei 0 °C durch tropfenweise Zugabe von 20 ml einer gesättigten Natriumsulfitlösung beendet, das Reaktionsgemisch in einen 250 ml-Kolben überführt und das organische Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird dreimal mit je 70 ml Dichlormethan extrahiert. Die wäßrige Phase wird mit 10%iger Salzsäure auf pH 5 angesäuert und anschließend dreimal mit je 70 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten etherischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trockenmittel durch Filtration abgetrennt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Trocknung im Ölpumpenvakuum verbleibt eine farblose Flüssigkeit (8.60 mmol, 1.32 g, 74 %). Analytik:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  = 3.72 (s) [1H], 7.24-7.35 (m) [5H], 11.5 (s) [1H];  $^{13}\text{C-}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  = 45.2 (s), 127.4 (s), 127.6 (s), 128.7 (s), 139.7 (s), 180.8 (s); MS (EI, 70 eV, pos. Ionen):  $m/z$  (% rel. Int.): 153 (24) [ $\text{M}^+$ ], 108 (100), 91 (8), 82 (5), 81 (8), 80 (5), 79 (10), 78 (8), 77 (6), 43 (11); EA: C: 70.35 % (ber. 73.56 %), H+D: 6.62 % (ber. 6.58 %); HPLC (Varian 5560, stat. Phase: 250 mm Chiracel OD-H, 4.6 mm i. D., mob. Phase: *n*-Heptan : 2-Propanol : Trifluoessigsäure = 98 : 2 : 0.1, 298 K, 1.2 MPa, 0.5 mL min<sup>-1</sup>, Detektion: UV 254 nm): 99.4 % *ee*.

Zum Ausschluss von möglicherweise störenden sekundären Isotopeneffekten, wurde die Reaktion der *pseudo*-Enantiomeren 21/22 mit der Reaktion des echten Racemats von 21 in einem Vorversuch verglichen. Die Daten in Abbildung 2 zeigen keine wesentlichen Unterschiede im Ergebnis, so dass sekundäre kinetische Isotopeneffekte ausgeschlossen werden können, die die Ergebnisse der Umsetzungen verfälschen könnten.

Sodann wurden etwa 1000 *ee*- und Umsatzbestimmungen pro Tag mit Hilfe der Konfiguration in Schema 2 bei Verwendung von Lipasen (Wildtyp und Mutanten) durchgeführt.

### Beispiel 3. Enantioselektive Hydrolyse von *meso*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten

Dieses Beispiel bezieht sich auf die Reaktionen einer prochiralen Verbindung, die enantiotopie Gruppen trägt (hier Acetoxygruppen).



#### Synthese von (1*S*,4*R*)-*cis*-1-Acetoxy-4-trideuteroacetoxy-2-cyclopenten (25):

In einem 100 ml-Stickstoffkolben werden unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss 5.79 mmol (823 mg) (1*S*,4*R*)-*cis*-4-Acetoxy-2-cyclopenten-1-ol (Fluka, 99 % *ee*), 6.95 mmol (1.20 Äq., 550 mg, 0.560 ml) Pyridin und 50 ml Dichlormethan vorgelegt und auf 0 °C (Eisbad) gekühlt. Unter Rühren werden innerhalb von 10 min 6.36 mmol (1.10 Äq., 688 mg, 600 µl) *d*<sub>6</sub>-Acetanhydrid (99 Atom% D, Aldrich) zutropft. Innerhalb von 12 h wird auf Raumtemperatur erwärmt und sukzessive mit je zweimal 40 ml 1 M Salzsäurelösung, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trockenmittel durch Filtration getrennt und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde auf Kieselgel aufgetragen und chromatographisch gereinigt (Laufmittel: Hexan : Essigsäureethylester = 3 : 1). Die Produktfraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Nach Trocknen im Ölpumpenvakuum verbleibt eine klare Flüssigkeit (1.01 g, 5.40 mmol, 93 %).

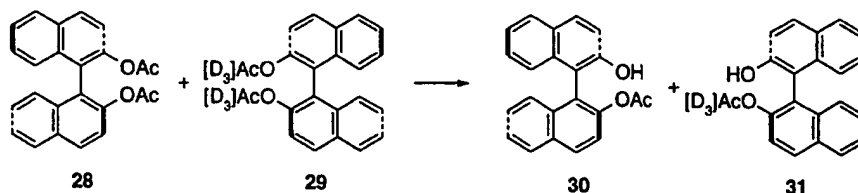
Analytik:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  = 1.71-1.78 (m) [2H], 2.07 (s) [3H], 2.83-2.93 (m) [2H], 5.55 (dd)  $^3J$  = 3.8 Hz,  $^2J$  = 7.5 Hz [2H], 6.10 (s) [2H];  $^{13}\text{C-}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  = 21.5 (s), 37.5 (s), 76.9 (s), 135.0 (s), 171.1 (s); MS (EI, 70 eV, pos. Ionen):  $m/z$  (% rel. Int.): 128 (9), 127 (3), 125 (9), 124 (3), 84 (17), 83 (81), 82 (82), 81 (16), 55 (6), 54 (24), 46 (100), 43 (92); EA: C: 57.75 % (ber. 57.74 %), H+D: 6.52 % (ber. 6.46 %).

In Vorversuchen wurde dann die Hydrolyse des Substrats **25** mit einer nicht-aktiven Lipase-Mutante (*P. aeruginosa* Mutante) und eines aktiven Enzyms (Schweineleberesterase, Sigma) untersucht. Repräsentative Massenspektren sind in Abbildung 3a und 3b gezeigt.

Die Daten in Abbildung 3a bestätigen das Ausbleiben der Reaktion, während die Daten in Abbildung 3b zu einem *ee*-Wert von 73 % führen. Die unabhängige Analyse mit herkömmlicher Gaschromatographie ergab einen *ee*-Wert 73 %, in exzellenter Übereinstimmung mit der ESI-MS-Analyse. Sodann wurden 1100 Proben pro Tag auf *ee*-Werte hin analysiert.

#### Beispiel 4. Enantioselektive Hydrolyse von Bisnaphthylacetaten

In diesem Beispiel wird die enantioselektive Hydrolyse einer 1 : 1-Mischung der *pseudo*-Enantiomere **28** und **29** untersucht.



Dazu wurden die *pseudo*-Enantiomere **28** und **29** in enantiomerenreiner Form hergestellt.

#### Synthese von (S,S)-1,1'-Bisnaphthyl-2,2'-diacetat (**28**):

In einem 50 ml-Stickstoffkolben werden unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss 5.00 mmol (1.43 g) (S,S)-1,1'-Bis-2-naphtol (> 99.9 % *ee*) in 20 ml Dichlormethan gelöst, mit 15.0 mmol (3.00 Äq., 1.19 g, 1.21 ml) Pyridin versetzt und auf 0 °C

(Eisbad) gekühlt. Unter Rühren werden innerhalb von 5 min 12.5 mmol (2.50 Äq., 985 mg, 888 µl) Acetylchlorid zugetropft. In einem Zeitraum von 12 h wird auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend sukzessive mit je zweimal 20 ml 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trockenmittel durch Filtration getrennt und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde auf Kieselgel aufgetragen und chromatographisch gereinigt (Laufmittel: Hexan : Essigsäureethylester = 7 : 3). Die Produktfraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Nach Trocknen im Ölpumpenvakuum verbleibt ein farbloser Feststoff (1.88 g, 4.99 mmol, 99 %). Analytik: <sup>1</sup>H-NMR (*d*<sub>6</sub>-DMSO, 300 MHz): δ = 1.83 (s) [2H], 6.94 (d) *J* = 8.3 Hz [2H], 7.29-7.34 (m) [2H], 7.48-7.55 (m) [4H], 8.05-8.15 (m) [4H]; <sup>13</sup>C-{<sup>1</sup>H}-NMR (*d*<sub>6</sub>-DMSO, 75 MHz): δ = 20.4 (s), 122.4 (s), 122.6 (s), 125.4 (s), 125.7 (s), 126.8 (s), 128.2 (s), 129.5 (s), 131.0 (s), 132.7 (s), 146.6 (s), 168.8 (s); MS (EI, 70 eV, pos. Ionen): *m/z* (% rel. Int.): 370 (13) [M<sup>+</sup>], 328 (37), 286 (100), 268 (9), 257 (7), 239 (10), 46 (11); IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3055 (w), 3019 (w), 2936 (w), 1760 (s), 1622 (m), 1595 (m), 1508 (m), 1472 (m), 1430 (m), 1367 (s), 1215 (s), 1130 (s), 1074 (m), 1012 (m), 813 (m), 761 (m); EA: C: 77.53 % (ber. 77.82 %), H: 4.92 % (ber. 4.90 %).

Synthese von (*R,R*)-1,1'-Bisnaphtyl-2,2'-bis(trideuteroacetat) (29):

In einem 50 ml-Stickstoffkolben werden unter Luft- und Feuchtigkeitsschluss 5.00 mmol (1.43 g) (*R,R*)-1,1'-Bis-2-naphtol (> 99.9 % *ee*) in 20 ml Dichlormethan gelöst, mit 15.0 mmol (3.00 Äq., 1.19 g, 1.21 ml) Pyridin versetzt und auf 0 °C (Eisbad) gekühlt. Unter Rühren werden innerhalb von 5 min 12.5 mmol (2.50 Äq., 1.019 g, 889 µl) *d*<sub>3</sub>-Acetylchlorid (> 99 Atom% D, Aldrich) zugetropft. In einem Zeitraum von 12 h wird auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend sukzessive mit je zweimal 20 ml 1 M Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, vom Trockenmittel durch Filtration getrennt und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde auf Kieselgel aufgetragen und chromatographisch gereinigt (Laufmittel: Hexan : Essigsäureethylester = 7 : 3). Die Produktfraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Nach Trocknen im

Ölpumpenvakuum verbleibt ein farbloser Feststoff (1.85 g, 4.99 mmol, 99 %).  
Analytik:  $^1\text{H}$ -NMR ( $d_6$ -DMSO, 300 MHz):  $\delta$  = 6.94 (d)  $J$  = 8.3 Hz, 7.27-7.34 (m) [2H], 7.48-7.55 (m) [4H], 8.05-8.15 (m) [4H];  $^{13}\text{C}$ -{ $^1\text{H}$ }-NMR ( $d_6$ -DMSO, 75 MHz):  $\delta$  = 20.4 (s), 122.4 (s), 122.6 (s), 125.4 (s), 125.7 (s), 126.8 (s), 128.2 (s), 129.5 (s), 131.0 (s), 132.7 (s), 146.6 (s), 168.8 (s); MS (EI, 70 eV, pos. Ionen):  $m/z$  (% rel. Int.): 376 (17) [ $\text{M}^+$ ], 332 (41), 288 (100), 268 (6), 259 (5), 240 (5), 46 (11); IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3054 (w), 3019 (w), 2268 (w), 2147 (w), 2092 (w), 1755 (s), 1622 (m), 1595 (m), 1509 (m), 1471 (m), 1231 (s), 1146 (s), 1075 (s), 1059 (s), 819 (s), 804 (s), 755 (s); EA: C: 76.23 % (ber. 76.85 %), H+D: 4.89 % (ber. 4.82 %).

Im Rahmen eines *High-Throughput-Screenings* zu *ee*- und Umsatzbestimmungen wurde die in Schema 3 beschriebene Geräteaufbau verwendet.

Wiederum wurden 1 : 1-Mischungen der *pseudo*-Enantiomere hergestellt und im *High-Throughput-Screening* von Lipase-katalysierten kinetischen Racematspaltungen eingesetzt.

Hierzu wurde ein Reflex II MALDI-TOF MS (engl. matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer) der Fa. Bruker-Franzen Analytik GmbH, Bremen, genutzt. Das Gerät ist mit einem  $\text{N}_2$ -Laser (264 nm) und einem 1 GHz *Digitizer* ausgerüstet. Es wurden maximal 40 Spektren automatisch aufgenommen und summiert.

Jede Probe wurde mittels eines Probenvorbereitungsroboters 1 : 1 (w/v) mit Matrixlösung (5%ige Trihydroxyacetophenon-Lösung in  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) versetzt und auf das MALDI-Target pipettiert.

In Abbildung 4 sind Ausschnitte ausgewählter MALDI-Massenspektren von Umsetzungen der *pseudo*-Enantiomere 28 und 29 mit Schweineleberesterase (Sigma) gezeigt. Aus den Signalintensitäten  $[\text{28} + \text{Na}]^+$  und  $[\text{29} + \text{Na}]^+$  wurden die Enantiomerenüberschüsse bestimmt (Abb. 4a. 40 % *ee*, Abb. 4b 54 % *ee*).

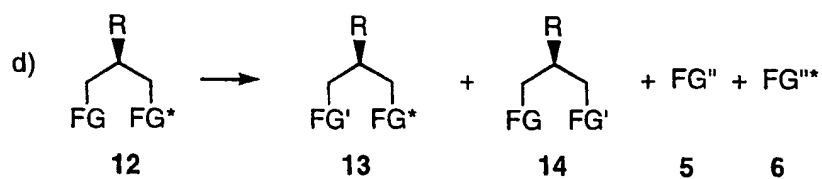
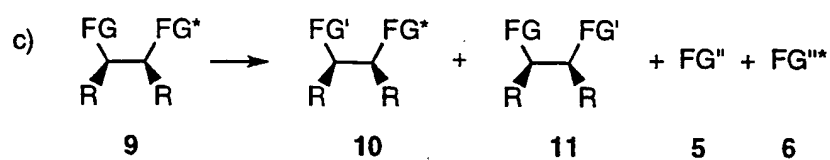
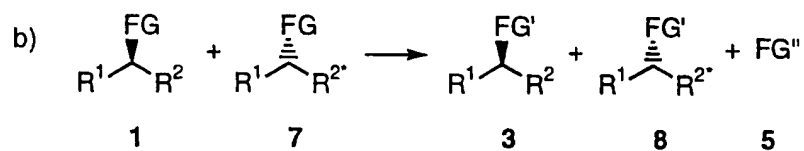
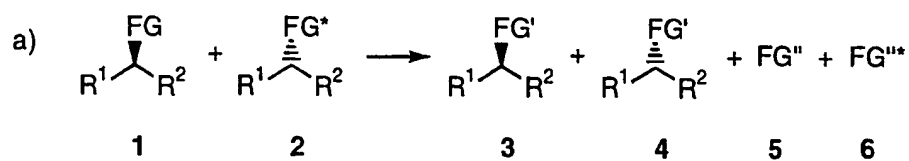
### Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Enantioselektivität von Proben, die Reaktionsprodukte von kinetischen Racematspaltungen an chiralen Substraten oder von stereoselektiven Reaktionen mit enantiotope Gruppen enthaltenden prochiralen Substraten sind, dadurch gekennzeichnet, dass
  - a) Substrate eingesetzt werden, die eine von der natürlichen Verteilung abweichende Isotopenverteilung aufweisen oder teilweise oder vollständig isotoopenmarkiert sind und
  - b) mit Hilfe eines isotoopenspezifischen Detektionssystems der Umsatz oder die relativen Verhältnisse der *pseudo*-Enantiomere oder die Enantiomerenüberschüsse quantitativ bestimmt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei als isotoopenspezifisches Detektionssystem eine massenspektrometrische Ionisierungsmethode eingesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die quantitative Bestimmung für eine Serie von Proben mit Hilfe eines Probenaufgaberoboters durchgeführt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Proben von einem oder mehreren Probenaufgaberobotern aus einer oder mehreren Mikrotiterplatten in ein oder mehrere Massenspektrometer transferiert werden.
5. Verfahren nach Anspruch 3 - 4, wobei als massenspektrometrische Ionisierungsmethode APCI (atmospheric pressure chemical ionization), CI (chemical ionization), EI (electron ionization), ESI (electrospray ionization), FAB (fast atom bombardment), FD (field desorption), FI (field ionization), LILBID (laser induced liquid beam ionization desorption), LSIMS (liquid secondary ion mass spectrometry), MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization), PB (particle beam), PD (plasma desorption), SIMS (secondary ion mass spectrometry), oder TSP (thermospray) oder eine Kombination solcher Ionisierungsmethoden angewandt wird.

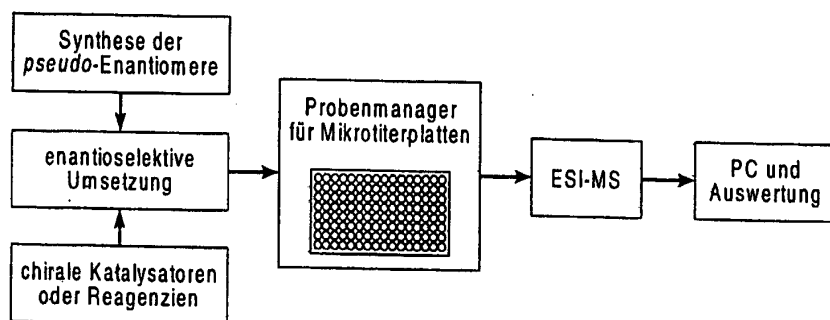
6. Verwendung des Verfahrens gemäß Ansprüchen 1 – 5 zur Auffindung oder Optimierung von Katalysatoren, die Reaktionen asymmetrisch katalysieren.
7. Verwendung des Verfahrens gemäß Ansprüchen 1 – 5 zur Auffindung von chiralen Agenzien, die in Reaktionen zur Anreicherung eines Enantiomers führen.
8. Verwendung nach Anspruch 6 zur Auffindung von Katalysatoren für die kinetische Racematspaltung von Alkoholen, Carbonsäuren, Carbonsäureestern, Aminen, Amiden, Olefinen, Alkinen, Phosphinen, Phosponiten, Phosphiten, Phosphaten, Halogeniden, Oxiranen, Thiolen, Sulfiden, Sulfonen, Sulfoxiden, Sulfonamiden sowie deren Derivate.
9. Verwendung nach Anspruch 6 zur Auffindung von chiralen Katalysatoren oder Agenzien für die stereoselektive Umsetzung von prochiralen Verbindungen, deren enantiotop Gruppen eine oder mehrere funktionelle Gruppen aus den Substanzklassen der Alkohole, Carbonsäuren, Carbonsäureester, Amine, Amide, Olefine, Alkine, Phosphine, Phosponite, Phosphite, Phosphate, Halogenide, Oxirane, Thiole, Sulfide, Sulfone, Sulfoxide oder Sulfonamide oder deren Derivate umfassen.
10. Verwendung nach Anspruch 6 zur Auffindung von Biokatalysatoren für die stereoselektive Synthese.
11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei Biokatalysatoren Enzyme, Antikörper, Proteine, Hormone, Phagen, Ribozyme, Peptide oder sonstige Biopolymere sein können.
12. Verwendung nach Anspruch 6 zur Auffindung von chiralen homogenen Katalysatoren für die stereoselektive Synthese.
13. Verwendung nach Anspruch 6 zur Auffindung von chiralen Metallkomplexen für die stereoselektive Synthese.

14. Verwendung nach Anspruch 6 zur Auffindung von chiral modifizierten heterogenen Katalysatoren für die stereoselektive Synthese.

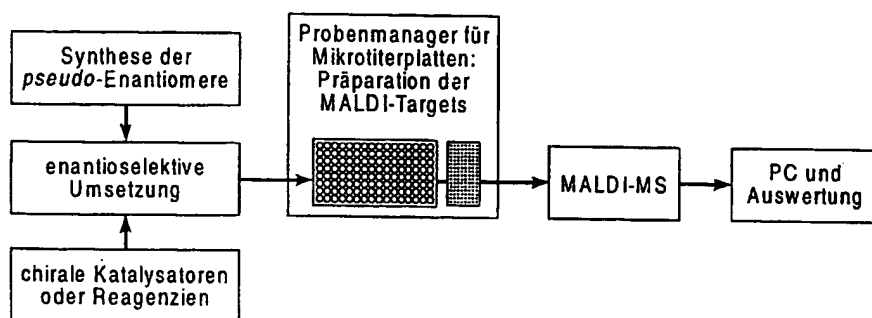
## Schema1/3



## Schema 2/3

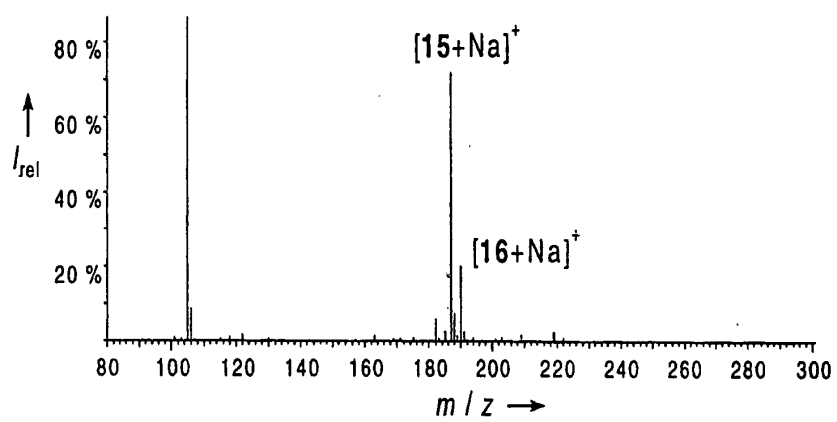


## Schema 3/3



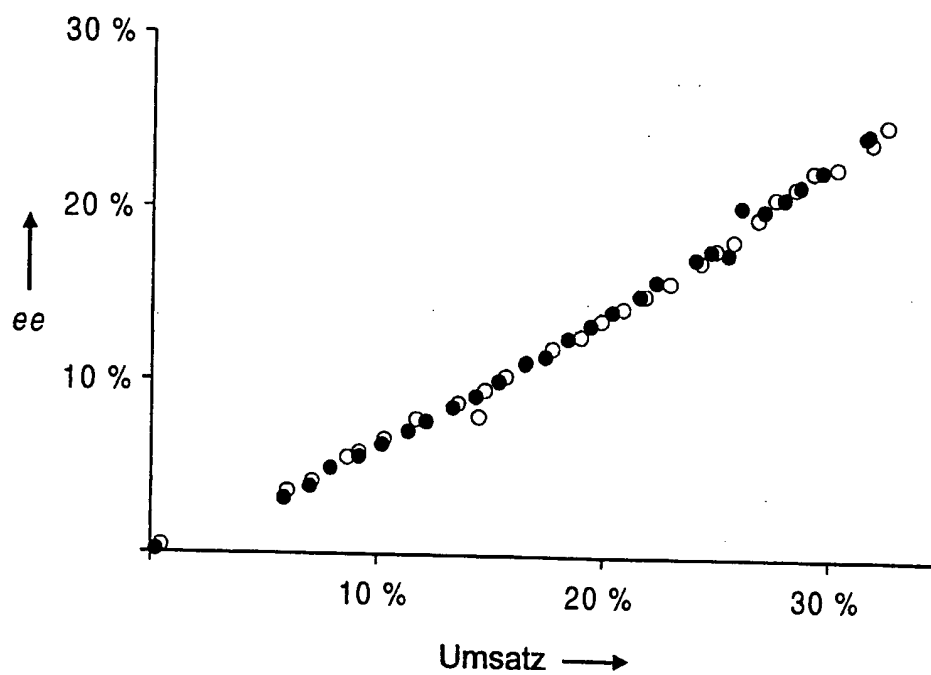
1/5

Abb. 1



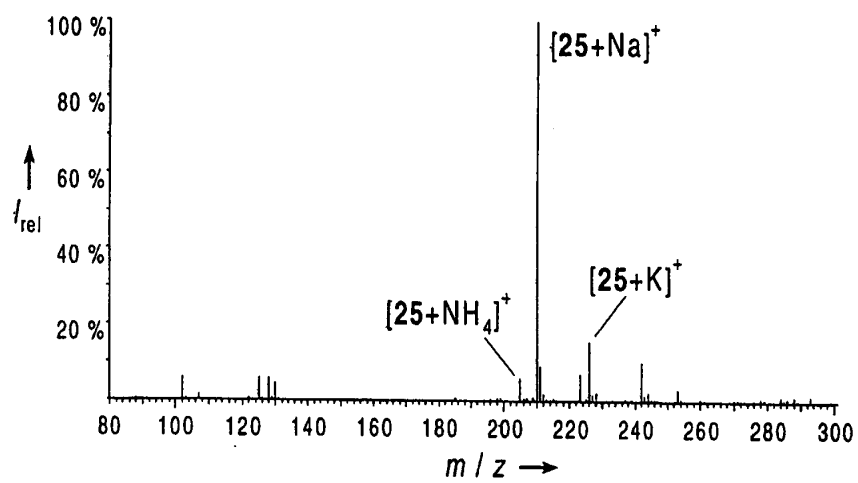
2/5

Abb. 2



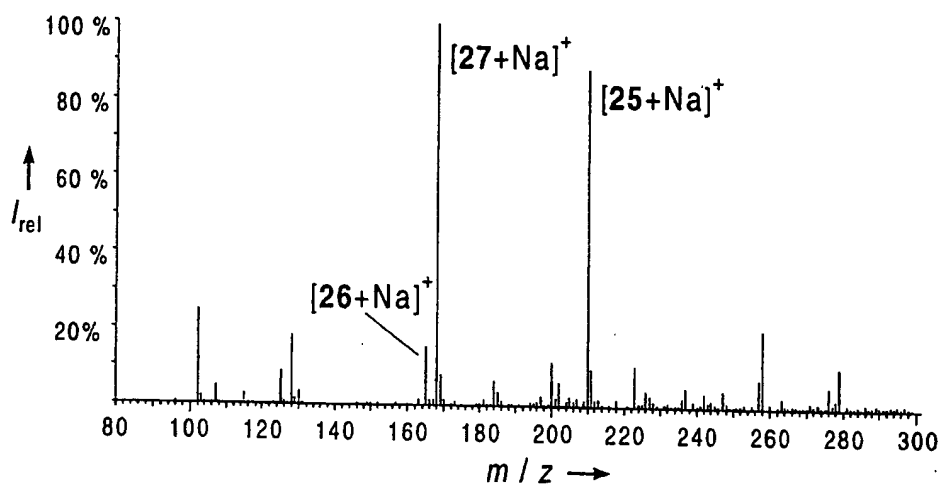
3/5

Abb. 3a



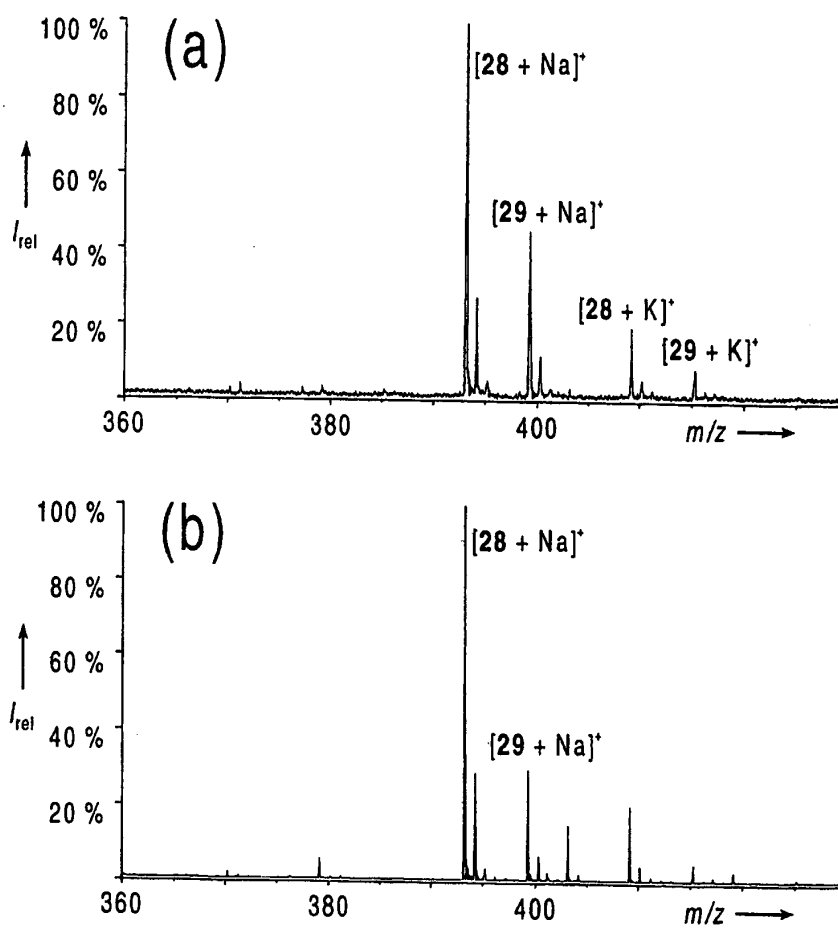
4/5

Abb. 3b



5/5

Abb. 4



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/02121

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12Q1/44 G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE CHEMICAL ABSTRACTS 'Online! AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (VIA STN KARLSRUHE); Accession Number 1999:145438 CAPLUS, GUO, J. ET AL: "Measurement of enantiomeric excess by kinetic resolution and mass spectrometry" XP002141731 abstract &amp; "BOOK OF ABSTRACTS, 217TH ACS NATIONAL MEETING, ANAHEIM, CALIF. (21-25 MARCH 1995)", AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, D.C.</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 July 2000

Date of mailing of the international search report

20/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/02121

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	REETZ ET AL: "Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by in vitro evolution" ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION, DE, VERLAG CHEMIE. WEINHEIM, vol. 36, no. 24, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 2830-2832, XP002087468 ISSN: 0570-0833 the whole document ---	1-14
Y	JAEGER K -E ET AL: "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, NL, ELSEVIER, AMSTERDAM, vol. 16, no. 9, September 1998 (1998-09), pages 396-403, XP004173187 ISSN: 0167-7799 page 401; figure 5 ---	1-14
Y	REETZ M T ET AL: "TIME-RESOLVED IR-THERMOGRAPHIC DETECTION AND SCREENING OF ENANTIOSELECTIVITY IN CATALYTIC REACTIONS" ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION, DE, VERLAG CHEMIE. WEINHEIM, vol. 37, no. 19, 1998, pages 2647-2650, XP000901132 ISSN: 0570-0833 the whole document ---	1-14
A	WO 99 05288 A (JAEGER KARL ERICH ;STUDIENGESELLSCHAFT KOHLE MBH (DE); ZONTA ALBIN) 4 February 1999 (1999-02-04) page 15, paragraph 3 -page 16, paragraph 2 ---	1-14
A	L E JANES, R J KAZLAUSKAS: "Quick E. A Fast Spectrophotometric Method To Measure the Enantioselectivity of Hydrolases " JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 62, 1997, pages 4560-4561, XP002141728 cited in the application the whole document ---	1-14
A	L E JANES, C LÖWENDAHL, R J KAZLAUSKAS: "Quantitative Screening of Hydrolase Libraries Using pH Indicators: Identifying Active and Enantioselective Hydrolases" CHEMISTRY - A EUROPEAN JOURNAL, vol. 4, no. 11, 1998, pages 2324-2331, XP002141729 cited in the application the whole document ---	1-14

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/02121

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	REETZ, MANFRED T. ET AL: "A method for high-throughput screening of enantioselective catalysts" ANGEW. CHEM., INT. ED. (1999), 38(12), 1758-1761 , XP002141730 the whole document ---	1-14
P,X	JAEGER KARL-ERICH; REETZ MANFRED T: "Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry" CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, vol. 4, February 2000 (2000-02), pages 68-73, XP000922816 page 70; figure 2 ---	1-14
T	SO, M. P. ET AL: "Differentiation of enantiomers using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry" RAPID COMMUN. MASS SPECTROM. (2000), 14(8), 692-695 , XP000922962 the whole document -----	1-14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/02121

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9905288 A	04-02-1999	DE 19731990 A EP 1002100 A	28-01-1999 24-05-2000

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02121

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12Q1/44 G01N33/58

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12Q G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EPO-Internal

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>DATABASE CHEMICAL ABSTRACTS 'Online! AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (VIA STN KARLSRUHE); Accession Number 1999:145438 CAPLUS, GUO, J. ET AL: "Measurement of enantiomeric excess by kinetic resolution and mass spectrometry" XP002141731 Zusammenfassung &amp; "BOOK OF ABSTRACTS, 217TH ACS NATIONAL MEETING, ANAHEIM, CALIF. (21-25 MARCH 1995)", AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, D.C.</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-14

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benützung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. Juli 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

20/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hart-Davis, J

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02121

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	REETZ ET AL: "Creation of enantioselective biocatalysts for organic chemistry by in vitro evolution" ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION,DE,VERLAG CHEMIE. WEINHEIM, Bd. 36, Nr. 24, 1. Januar 1998 (1998-01-01), Seiten 2830-2832, XP002087468 ISSN: 0570-0833 das ganze Dokument ---	1-14
Y	JAEGER K -E ET AL: "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY,NL,ELSEVIER, AMSTERDAM, Bd. 16, Nr. 9, September 1998 (1998-09), Seiten 396-403, XP004173187 ISSN: 0167-7799 Seite 401; Abbildung 5 ---	1-14
Y	REETZ M T ET AL: "TIME-RESOLVED IR-THERMOGRAPHIC DETECTION AND SCREENING OF ENANTIOSELECTIVITY IN CATALYTIC REACTIONS" ANGEWANDTE CHEMIE. INTERNATIONAL EDITION,DE,VERLAG CHEMIE. WEINHEIM, Bd. 37, Nr. 19, 1998, Seiten 2647-2650, XP000901132 ISSN: 0570-0833 das ganze Dokument ---	1-14
A	WO 99 05288 A (JAEGER KARL ERICH ;STUDIENGESELLSCHAFT KOHLE MBH (DE); ZONTA ALBIN) 4. Februar 1999 (1999-02-04) Seite 15, Absatz 3 -Seite 16, Absatz 2 ---	1-14
A	L E JANES, R J KAZLAUSKAS: "Quick E. A Fast Spectrophotometric Method To Measure the Enantioselectivity of Hydrolases " JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, Bd. 62, 1997, Seiten 4560-4561, XP002141728 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-14
A	L E JANES, C LÖWENDAHL, R J KAZLAUSKAS: "Quantitative Screening of Hydrolase Libraries Using pH Indicators: Identifying Active and Enantioselective Hydrolases" CHEMISTRY - A EUROPEAN JOURNAL, Bd. 4, Nr. 11, 1998, Seiten 2324-2331, XP002141729 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-14

-/--

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02121

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	REETZ, MANFRED T. ET AL: "A method for high-throughput screening of enantioselective catalysts" ANGEW. CHEM., INT. ED. (1999), 38(12), 1758-1761 , XP002141730 das ganze Dokument ----	1-14
P,X	JAEGER KARL-ERICH; REETZ MANFRED T: "Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry" CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, Bd. 4, Februar 2000 (2000-02), Seiten 68-73, XP000922816 Seite 70; Abbildung 2 -----	1-14
T	SO, M. P. ET AL: "Differentiation of enantiomers using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry" RAPID COMMUN. MASS SPECTROM. (2000), 14(8), 692-695 , XP000922962 das ganze Dokument -----	1-14



